

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

E.A.P DE ODONTOLOGÍA

**“EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO
DE LA PASTA TRI MIX FRENTE A
ACTINOMYCES ODONTOLYTICUS Y
PORHPYROMONA GINGIVALIS”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Liliana Elizabeth Ayala Cabello

ASESOR

Katia Medina Calderón

Lima – Perú

2015

A DIOS, mi mejor amigo que siempre está presente en todo momento

De mi vida y ser mi guía ante cualquier circunstancia.

A mi padre, madre y hermanos por su

constante apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora, C.D Katia Medina Calderón docente del Dpto. de Odontología Preventiva y Social de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por sus conocimientos, apoyo, colaboración y disposición de tiempo.
- A la Blga. Elba Martínez Cadillo, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo incondicional y paciencia durante la siembra de bacterias y recolección de datos.
- Al Dr. Víctor Manuel Chumpitaz Cerrate, docente del Dpto. de Farmacología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo de investigación.
- A la Mg. Hilda Moromi Nakata, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su apoyo incondicional y sugerencias durante la siembra de bacterias.
- Al C.D Marco Tulio Palomino Murguía, asistente del Servicio de Endodoncia, del Departamento de Odontología del Hospital Nacional Hipólito Unanue.
- Al Lic. Rocky Champi Merino, asistente del servicio de Microbiología, del Departamento de Laboratorio del Hospital Nacional Hipólito Unanue.
- A la Srta. Violeta Chavesta Velásquez, que trabaja en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Al Blgo. Alejandro Patiño Gabriel, docente del Dpto. de Microbiología de la Facultad de Odontología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarme sus conocimientos y recomendaciones durante el desarrollo de la ejecución de la presente investigación.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar y comparar la efectividad antibacteriana de la pasta Tri mix e hidróxido de calcio frente a las bacterias *Porphyromona gingivalis* y *Actinomyces odontolyticus* prevalentes en conductos radiculares necróticos de dientes jóvenes. Se utilizaron dos cepas ATCC® *Actinomyces odontolyticus* (bacteria anaerobia facultativa) y *Porphyromona gingivalis* (bacteria anaerobia estricta) y se empleó el Método de Difusión en Pozos (MDP) en condiciones de anaerobiosis. Se realizó el primer control a la semana en el caso de *Actinomyces odontolyticus* y a los 20 días en el caso de *Porphyromonas gingivalis*. La mayor actividad antibacteriana fue dada por la pasta Tri mix, la cual presentó un halo de inhibición de 38 mm. La bacteria *Porphyromona gingivalis* fue inhibida completamente.

Summary

The aim of this study was to evaluate and compare the antibacterial activity between the Tri mix and calcium hydroxide paste against the bacterias *Porphyromona gingivalis* y *Actinomyces odontolyticus* prevalent in immature teeth with necrotic pulps. For this study were used two ATCC® strains *Porphyromona gingivalis* (*stric anaerobic bacterias*) and *Actinomyces odontolyticus* (*facultative anaerobic bacterias*) by Difussion method in wells in anaerobic conditions. The reading of results was made at one week to *Actinomyces odontolyticus* and twenty days to *Porphyromona gingivalis*. *The biggest antibacterial activity was produced by Tri mix paste, it showed a halo of inhibition 38 mm. The Porphyromona gingivalis was inhibited complety.*

INDICE

Pág.

RESUMEN

SUMMARY

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	09
II.	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
2.1.	Área problema	10
2.2.	Delimitación	10
2.3.	Formulación	11
2.4.	Objetivos	11
2.5.	Justificación	12
2.6.	Limitaciones	12
III.	MARCO TEÓRICO.....	14
3.1.	Antecedentes	14
3.2.	Bases teóricas	17
3.2.1.	La pulpa dental.....	17
3.2.1.1	Definición.....	17
3.2.1.2	Factores etiológicos de la enfermedad pulpar y periapical	18
3.2.2	Microbiología de los conductos radiculares	18
3.2.1.1.	Composición y diversidad microbiana.....	18
3.2.1.2.	Cuadro de bacterias aerobias y anaerobias facultativas aisladas en dientes con necrosis pulpar.....	20
3.2.1.3.	Cuadro de bacterias anaerobias estrictas aisladas en conductos con necrosis pulpar.....	21
3.2.3	Inflamación pulpar	23
3.2.4	Inflamación periapical.....	24

3.2.5	Revascularización	26
3.2.6	Descontaminación de canales radiculares.....	26
3.2.6.1	Sustancias químicas auxiliares.....	26
3.2.6.2	Medicación intraconducto.....	27
3.2.6.2.1	Pasta de hidróxido de calcio.....	28
3.1.6.2.2	Pasta triantibiótica.....	28
3.2	Definición de términos.....	34
3.3	Hipótesis	34
3.4	Operacionalización de variables	36
IV.	METODOLOGÍA.....	37
4.1	Tipo de investigación	37
4.2	Población y muestra.....	37
4.3	Materiales y métodos.....	39
4.4	Recolección de datos.....	42
4.5	Procesamiento y análisis de datos.....	42
V.	RESULTADOS	44
VI.	DISCUSIÓN	51
VII.	CONCLUSIÓN	55
VIII.	RECOMENDACIONES.....	56
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	57
X.	ANEXOS.....	61

Ficha de recolección de datos para *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

Lista de cuadros

Cuadro 1: Efectividad antibacteriana de la pasta Tri mix e hidróxido de calcio frente a <i>Actinomyces odontolyticus</i>	45
---	----

Lista de gráficos

Gráfico 1: Efectividad antibacteriana de la pasta Tri mix frente a <i>Actinomyces odontolyticus</i>	47
--	----

Gráfico 2: Efectividad antibacteriana de la pasta de hidróxido de calcio frente a <i>Actinomyces odontolyticus</i>	48
---	----

Gráfico 3: Efectividad antibacteriana de agua destilada frente a <i>Actinomyces odontolyticus</i>	49
--	----

Gráfico 4: Comparación de medias de la efectividad antibacteriana frente a <i>Actinomyces odontolyticus</i>	50
--	----

Lista de anexos

Anexo 1: Ficha de recolección de datos.....	61
--	----

Anexo 2: Fotos.....	62
----------------------------	----

EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LA PASTA TRI MIX FRENTE A *Porphyromona gingivalis* y *Actinomyces odontolyticus*.

I. INTRODUCCIÓN

Los dientes jóvenes con necrosis pulpar debido a sus características, reciben tratamientos endodónticos más complejos. Cuando estos dientes presentan necrosis pulpar existen bacterias anaerobias estrictas y facultativas que son difíciles de eliminar. Generalmente, cuando esto ocurre, se realiza el tratamiento de apexificación, cuya finalidad es buscar la inducción del cierre apical a través de la formación de tejido mineralizado. A pesar de la eficacia del tratamiento de apexificación, este presenta múltiples desventajas, como por ejemplo; nivel de complejidad variable, grado de colaboración del paciente, múltiples citas, entre otros. Asimismo, debido a la presencia de paredes delgadas y frágiles, este tipo de tratamiento puede conllevar a una fractura post- tratamiento. En vista de este problema, en la actualidad se ha puesto en boga el tratamiento de revascularización pulpar para dientes jóvenes con necrosis pulpar, para lo cual es requisito obtener la máxima eliminación de microorganismos residentes en conductos radiculares; y para ello es necesario la utilización de medicación intraconducto, como la pasta Tri mix o de hidróxido de calcio, las cuales se ha demostrado en investigaciones clínicas e *in vitro* que presentan efectividad antibacteriana frente a la microbiota presente en este tipo de patología.

En la presente investigación se comparó la efectividad antibacteriana *in vitro* de la pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio frente a *Actinomyces odontolyticus* (bacteria anaerobia facultativa) y *Porphyromona gingivalis* (bacteria anaerobia estricta) prevalentes en necrosis pulpar, con la finalidad de contribuir a las investigaciones realizadas hasta la actualidad.

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1 Área problema

La mayoría de casos de necrosis pulpar en dientes jóvenes es considerada una infección polimicrobiana, que incluye en su mayoría bacterias anaerobias estrictas y bacterias anaerobias facultativas. Asimismo el éxito de todo tratamiento pulpar en dientes jóvenes con necrosis pulpar depende básicamente de la máxima eliminación de microorganismos del conducto radicular. Existen una variedad de pastas antibióticas utilizadas en terapia pulpar de dientes jóvenes, la convencional: pasta de hidróxido de calcio y la pasta Tri mix, que son muy utilizadas por ser consideradas excelentes alternativas como medicación intraconducto en el tratamiento de revascularización en dientes necróticos jóvenes.

2.2 Delimitación del problema

La microbiota de los conductos radiculares con necrosis pulpar de dientes jóvenes están dominadas por bacterias anaerobias estrictas (90%), facultativas (9%) y aerobias (1%) los cuales son difíciles de eliminar totalmente, por consiguiente, dificulta la esterilización completa de los conductos radiculares. Entre las bacterias anaerobias facultativas más frecuentes tenemos a la *Actinomyces odontolyticus* y entre las bacterias anaerobias estricta la *Porphyromona gingivalis*.

En la actualidad existe una opción de tratamiento llamado revascularización para dientes jóvenes (dientes con formación radicular inconclusa), este método consiste en la máxima eliminación de microorganismos de los conductos radiculares utilizando pastas antibióticas, para posteriormente inducir la formación de coágulo sanguíneo, que proporcionará nuevas células que producirán la formación, el cierre radicular y vitalidad pulpar.

2.3 Formulación del problema

¿La pasta Tri mix tendrá mayor efectividad antibacteriana in vitro que la pasta de hidróxido de calcio contra *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* frecuentes en conductos radiculares necróticos?

2.4 Objetivos de la investigación

2.4.1 Objetivo general

Comparar la efectividad antibacteriana in vitro de la pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio frente a *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* frecuentes en conductos radiculares necróticos de dientes jóvenes.

2.4.2 Objetivos específicos:

- Determinar la efectividad antibacteriana in vitro de la pasta Tri mix frente a *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* frecuentes en conductos radiculares necróticos de dientes permanentes jóvenes
- Determinar la efectividad antibacteriana in vitro de la pasta de hidróxido de calcio frente a *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* frecuentes en conductos radiculares necróticos de dientes permanentes jóvenes.
- Comparar la efectividad antibacteriana in vitro de la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio frente a *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* frecuentes en conductos radiculares necróticos de dientes permanentes jóvenes.

2.5 Justificación de la investigación

La revascularización es considerada como una excelente alternativa de tratamiento para la conservación de dientes jóvenes en funcionamiento. En la actualidad es frecuente el uso de pastas de medicación intraconducto para tratamientos de revascularización como la pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio. Asimismo, los dientes jóvenes con necrosis pulpar constituyen un problema importante dentro de la Endodoncia por ser dientes definitivos en boca; presentar bacterias anaerobias estrictas y facultativas, foramen apical abierto paredes radiculares delgadas y desarrollo inconcluso de la raíz.

La pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio son buenas alternativas en tratamientos de revascularización, porque esteriliza gran parte de bacterias presentes en conductos radiculares infectados y repara el tejido perirradicular dañado. En nuestro país existe poca información en relación de las propiedades y actividad antibacteriana de la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio. El presente trabajo ha evaluado, determinado y comparado la efectividad antibacteriana para ambas pastas contra *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*, bacterias más frecuentes en conductos radiculares necróticos de dientes jóvenes.

2.6 Limitaciones de la investigación

- Disponibilidad de medios de cultivo y reactivos para la identificación de *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.
- Instrumentos y materiales de laboratorio necesario para trabajar con *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

- El elevado costo económico que representa procesar las bacterias *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.
- Lograr trabajar en un ambiente estéril in vitro y evitar una contaminación cruzada.

III. Marco teórico

3.1 Antecedentes

Gangwar A (2011)¹ realizó un estudio para determinar la efectividad antibacteriana de diferentes pastas de medicación intraconducto preparadas a base de hidróxido de calcio y utilizando diferentes vehículos (suero fisiológico, glicerina Excelsa R, paramonoclorofenol y Rexidine-M gel). Se aislaron bacterias anaerobias (*Lactobacillus species*), aerobias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus faecalis*) y *Candida albicans*. Se demostró una mayor efectividad antibacteriana para la pasta a base de hidróxido de calcio y paramonoclorofenol; y menor efectividad antimicrobiana para la pasta a base de hidróxido de calcio y suero fisiológico.

Sato J, et al (1996)² determinaron la efectividad antibacteriana de una pasta antibiótica a base de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina dentro de conducto radiculares infectados. La penetración y efectividad antibacteriana de dicha pasta, se calcularon a través del recuento de bacterias, y medición de halos de inhibición. Ninguna bacteria fue recuperada después de las 48 h.

Nanda R, et al (2014)³ realizaron un estudio para evaluar y comparar clínica y radiográficamente la efectividad de dos pastas de medicación intraconducto, que fueron usados sin realizar instrumentación en dientes deciduos necróticos. Para este estudio se seleccionaron 40 dientes deciduos infectados que fueron divididos aleatoriamente en dos grupos (A y B). En el grupo A, se utilizó una pasta antibacteriana a base de ciprofloxacino, metronidazol, y minociclina y en el grupo B, se utilizó una pasta antibacteriana a base de ciprofloxacino, ornidazol y minociclina. Se rellenaron los conductos radiculares de cada grupo, con las pastas antibióticas respectivas y se restauraron con ionómero de vidrio. La evaluación clínica y radiográfica se llevó a cabo a los 3, 6, y 12 meses. Ambos grupos mostraron éxito

clínicamente después de tres meses. El éxito radiográfico que evidenció el grupo A tuvo fue de 81% y de 92% del grupo B.

Windley W, et al (2005)⁴ estudiaron la efectividad antibacteriana de la pasta Tri mix (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) frente a bacterias presentes en dientes jóvenes de perros con periodontitis apical. Se tomaron muestras de los conductos radiculares antes de irrigarlos con 1,25% NaOCl (S1), después de irrigarlos con 1,25% NaOCl (S2) y después de medicar con la pasta de tri mix (S3). Se obtuvo un cultivo positivo para bacterias de el 100% en S1, con un recuento medio de UFC de 1.7×10^8 . En S2 el 10% de las muestras de cultivo estuvieron libres de bacterias, con un recuento de CFU de $1,4 \times 10^4$. En S3 el 70% de las muestras de cultivos estuvieron libres de bacterias, con un recuento medio de UFC de 26.

Muñante, J (2005)⁵ realizó un estudio de identificación de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos más frecuentes en necrosis pulpar, los géneros bacterianos más frecuentes aislados fueron: *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* y *Lactobacillus*. Y las especies más frecuentes aisladas fueron *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Veillonella parvula*.

Lana et al (2001)⁶ analizó 31 conductos radiculares con diagnóstico de necrosis pulpar, antes y después de su manipulación o preparación biomecánica. Los géneros aislados que presentaron mayor frecuencia fueron: *Prevotella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Peptostreptococcus*. El 82% de los conductos evaluados mostraron infección polimicrobiana. Las bacterias anaerobias estrictas fueron recuperadas en un 80% de los casos, las bacterias anaerobias facultativas en el 51% y las especies microaerofilas en un 18.5 % de los casos

T. Takushige (2001)⁷ evaluaron la efectividad antibacteriana de la pasta 3 mix-MP en terapias de esterilización y reparación tisular en piezas dentales con perforaciones radiculares crónicas y lesiones perirradiculares. La pasta 3 mix-MP fue colocada dentro de las cavidades de las piezas dentales. De los 57 casos estudiados 45 (79%) fueron clasificados como buenos clínicamente, las lesiones perirradiculares se redujeron y desaparecieron. En 9 casos (16%) las lesiones perirradiculares no fueron radiográficamente evidentes. En 3 casos (4%) fueron catalogados como tratamientos exitosos después del tratamiento.

Rojas et al (2004)⁸ evaluaron y compararon el método de pozos en agar modificado y el método de Kirby-Bauer, para determinar la efectividad antibacteriana de los extractos acetónico, acuoso y etanólico de *Spilantes americana* a cuatro concentraciones (0; 0,08; 5 y 20 mg/ml) frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Strptococcus B hemolítico*, *Saccharomyces cerevisae*. Los resultados mostraron una fuerte correlación entre los dos métodos, además el método de pozos fue mucho más sensible que el método de Kirby Bauer para determinar la efectividad antibacteriana.

Adnan H., et al (2011)⁹ estudiaron la efectividad antibacteriana de tres selladores endodónticos comunmente usados, a base de hidróxido de calcio, óxido de zinc-eugenol y resina, frente cuatro bacterias anerobias facultativas y cuatro bacterias anaerobias estrictas, utilizaron el metodo de difusión en pozos, dicho estudio mostró que los menores diámetros de halos de inhibición fueron formados por el sellador a base de hidróxido de calcio (1.2 mm), y los mayores diámetros de halos de inhibición fueron formados por el sellador a base de óxido de zn- eugenol (14.9 mm) y a base de resina (2.2mm).

Quispe, A (2007)¹⁰ realizó un estudio donde se comprobó la efectividad antibacteriana de la combinación de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina, frente a un grupo de

anaerobias facultativas y estrictas. La efectividad de la combinación de estos antibióticos fue mayor frente a bacterias anaerobias estrictas que facultativas.

Aas, A (2005)³⁷ realizó un estudio donde comprobó que en dientes con infección endodóntica necrótica hay predominio de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Spirochaetes*, *Candida albicans*, *Campylobacter* y *Actinomyces*.

Carreira C., et al (2007)⁴¹ determinaron la efectividad antibacteriana de ciprofloxacino, metronidazol, polyetilenglicol y natrosol, a diferentes concentraciones y combinaciones frente a bacterias aerobias, anaerobias facultativas y utilizaron el método de dilución agar. La concentración mínima inhibitoria hallada para el ciprofloxacino fue 4 ug/ml y para el metronidazol 16 ug/ml. La mayoría de las bacterias fue sensible al ciprofloxacino, pero todas las bacterias mostraron resistencia al metronidazol. La combinación de ciprofloxacino y polyetilenglicol mostró un incremento de la efectividad antibacteriana de ambos productos.

3.2 Bases teóricas:

3.2.1 La pulpa dental

3.2.1.1 Definición

Es un tejido conjuntivo laxo, origen mesenquimatoso que se encuentra dentro de la cámara pulpar y de los conductos radiculares, que forman junto con la dentina el complejo dentinopulpar.¹⁵

La pulpa dental presenta un alto contenido de células (fibroblastos, macrófagos y linfocitos), fibras reticulares, fibras colágenas, líquido tisular, sustancia fundamental amorfa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, y nervios.¹⁵

Las funciones del tejido pulpar son formación de dentina, función sensitiva, función de nutrición, y función de protección.¹⁵

3.2.1.2 Factores etiológicos de la enfermedad pulpar y periapical

Los factores capaces de provocar infección y necrosis pulpar, así como sus complicaciones periapicales, son divididos en cuatro categorías:¹⁵

a) **Factores bacterianos;** las bacterias y sus productos, representan las causas más frecuentes de enfermedad endodóntica. Las bacterias pueden llegar a la pulpa dental, a través de muchas vías como caries dental, traumatismos, filtraciones, anormalidades de desarrollo ,etc.¹⁵

b) **Factores traumáticos;** los traumatismos por accidentes, pueden ser variables; ya que algunas pulpas curan sin efectos adversos, mientras otros experimentan necrosis pulpar. Los traumatismos que provocan exposición pulpar, causan inflamación, debido a la contaminación pulpar por bacterias.¹⁵

c) **Factores iatrogénicos;** involucra todos los procedimientos restauradores que generan calor y desecación de túbulos dentinarios, así como productos y sustancias químicas que puedan producir una irritación pulpar.¹⁵

d) **Factores idiopáticos;** involucra factores desconocidos que pueden provocar enfermedad pulpar y periapical.¹⁵

3.2.2 Microbiología en los conductos radiculares necrótico

3.2.2.1 Composición y diversidad microbiana

La infección intrarradicular primaria es la infección del tejido necrótico de la pulpa. Los microorganismos involucrados, pueden haber estado implicados en las primeras fases de la invasión de la pulpa, a través de una caries, inflamación y posterior necrosis; así también pueden haber sido los últimos en llegar y aprovecharon las condiciones ambientales predominantes en el conducto radicular.¹⁵

Las infecciones primarias se caracterizan por la presencia de una comunidad variada, con predominio de bacterias anaerobias. El número de bacterias oscila entre 10^3 y 10^8 por conducto radicular, asimismo los estudios moleculares muestran la presencia de 10 a 20 especies por conducto infectado y que cuanto mayor sea la lesión, mayor será la diversidad y densidad bacteriana dentro del conducto.¹⁵

Las especies bacterianas que se detectan con mayor frecuencia en las infecciones primarias, incluido los casos abscesificados, pertenecen a diversos géneros de bacterias grampositivas (*Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*) y gramnegativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veillonella*). La prevalencia de las bacterias en las infecciones primarias es variable en cada estudio, ya que depende de varios factores, como la sensibilidad y especificidad de los métodos de detección e identificación, la técnica de la obtención de la muestra, la localización geográfica y la concordancia o divergencia entre el diagnóstico clínico y la clasificación de la enfermedad.^{6,15,37}

Bacterias aerobias y anaerobias facultativas aisladas en dientes con necrosis pulpar ¹⁰

Forma	Tinción	Género	Especie
Cocos	Gram positivos	<i>Streptococcus</i>	<i>mitis, milleris, oralis, intermedius, morbillorum, constellatus, sanguis, mitior.</i>
		<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis, faecium.</i>
		<i>Staphylococcus</i>	<i>aereus, epidermidis</i>
Bacilos	Gram positivos	<i>Actinomyces</i>	<i>odontolyticus, naeslundii, israeli, meyeri, viscosus</i>
		<i>Propionobacterium</i>	<i>acnes, propionecus</i>
	Gramnegativos	<i>Eikenella</i>	<i>Corrodens</i>
		<i>Capnocytophaga</i>	<i>Ochracea</i>
		<i>Actinobacillus</i>	<i>Sp</i>
			<i>rectus</i>
		<i>Campylobacter</i>	<i>sputorum, corvus</i>
Levaduras	<i>Candida</i>		<i>albicans, glabrata, guilliermondi</i>
	<i>Geotrichum</i>		<i>Candidum</i>

Bacterias anaerobias estrictas aisladas en conductos radiculares ¹⁰

Forma	Tinción	Género	Especie
Cocos	Gram positivos	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>micros, anaerobius, prevotii, magnus, assacharolitycus.</i>
		<i>Peptococcus</i>	<i>sp.</i>
	Gram negativos	<i>Veillonella</i>	<i>parvula.</i>
Bacilos	Gram positivos	<i>Eubacterium</i>	<i>nodatum, lentum, timidum, alactolyticum, brachy.</i>
	Gram negativos	<i>Porphyromonas</i>	<i>gingivalis.</i>
			<i>endodontalis.</i>
		<i>Prevotella</i>	<i>intermedia.</i>
			<i>nigrescences.</i>
			<i>oralis, oris, bucae.</i>
		<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum, fusiformis, varium, necrophorum.</i>
		<i>Selenomonas</i>	<i>sputigena.</i>
		<i>Treponomas</i>	<i>denticola, vancetii, pectinovorum, socranski</i>
		<i>Mitsoukella</i>	<i>sp</i>

Porphyromona gingivalis

Es una especie de bacilos Gram negativo pequeño (cocobacilos), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosa, parda o negra, debido a la hemina que almacena en la superficie celular. Coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, en los cuales hay substratos de nitrógeno. Tiene un requerimiento obligado de hierro para crecer, sin embargo cuando existe falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria, utiliza hemina.

Es comúnmente detectada en pacientes jóvenes con gingivitis y pacientes adultos con periodontitis. Esta especie también es encontrada en placas supragingivales maduras.

Se ha demostrado que LPS de esta especie induce a la producción de IL-6 e IL-8 desde fibroblastos del ligamento periodontal en humanos. Las evidencias indican que LPS de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente su Lipido A, es capaz de estimular la respuesta inflamatorio del hospedero indirectamente a través de la producción de citokinas. Produce gran cantidad de enzimas, proteinasas y productos finales de su metabolismo que son activos contra un amplio espectro de proteínas del hospedero y esta provista de mecanismos para evadir las defensas del hospedero. Dichos compuestos corresponden a inhibidores de proteinasas, inmunoglobulinas, proteinasas que contienen hierro, proteínas bactericidas, proteínas de matriz extracelular y proteínas envueltas en funciones fagocíticas, tales como fijación de complemento y coagulación, los cuales actúan sobre el hospedero, y pueden jugar un rol significativo en la progresión de la periodontitis.²²

Una de las características de virulencia significativa de *Porphyromona gingivalis* es presentar enzimas hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas, etc; varias de estas proteinasas asociadas a *Porphyromonas gingivalis* parecen ser funcionalmente importantes en el medioambiente *in vivo*. Estos factores de virulencia *in vivo*, si actúan en el hospedero, pueden jugar un rol significativo en la progresión de la periodontitis.

Actinomyces odontolyticus

Es un género de bacterias Gram positivas, anaerobia facultativa, con localización preferente en la cavidad oral. Son microorganismos con un gran pleomorfismo, pudiendo aparecer aislados, en parejas, en cúmulos irregulares similares a los rayos de sol o en cadenas similares a hifas. Su metabolismo es de tipo heterofermentativo, produciendo ácidos a partir de los hidratos de carbono.

En cavidad oral, las especies de *Actinomyces* se detectan frecuentemente en zonas con bajos niveles de oxígeno. A nivel oral, *Actinomyces odontolyticus* está relacionado al avance de lesiones cariosas. Se ha descrito como la especie más prevalente tanto en placa supragingival en pacientes periodontales, lesiones periapicales crónicas refractarias a tratamientos de endodoncia. En algunos estudios, hallaron mayores niveles de *Actinomyces* en pacientes sin enfermedad periodontal que en aquellos con enfermedad periodontal crónica no tratada.²³

3.2.3 Inflamación pulpar

Se da a través de varias etapas, inicia con la formación de dentina reparadora por los odontoblastos frente a los factores irritantes, aunque pueden llegar a destruirse en caso que persista la agresión.^{10, 15}

La inflamación pulpar puede dividirse en aguda y crónica

a) **Inflamación aguda:** es provocada por la llegada de componentes bacterianos a la pulpa dental, a través de los túbulos dentinarios, hay formación de edema. Las células polimorfonucleares se van marginando hacia la periferie de los vasos, atraídas por moléculas mediadoras de la inflamación.^{10,15}

b) **Inflamación crónica:** en esta etapa se libera dos tipos de mediadores de la inflamación, los que destruyen tejidos y los que estimulan la reparación. El tejido

pulpar se va destruyendo de mayor a menor velocidad, mediante fenómenos de necrosis por coagulación y licuefacción.^{10,15}

Clasificación de enfermedades pulpares

Patología pulpar

Se clasifican en: pulpitis reversible, pulpitis irreversible y necrosis pulpar.

a) *Pulpitis reversible:* es una inflamación que se caracteriza por ser transitoria, se produce un dolor agudo; pero temporal, debido a irritantes externos como la caries, tallados protésicos, iatrogenias, etc. Si estos estímulos son tratados y diagnosticados a tiempo, se puede recuperar la vitalidad pulpar, con pronóstico favorable.¹⁵

b) *Pulpitis irreversible:* es la inflamación de la pulpa, sin capacidad de recuperación, presenta dos formas sintomática y asintomática, cualquiera fuese el caso requiere tratamiento endodóntico.¹⁵

c) *Necrosis pulpar:* es la muerte de la pulpa como resultado de una pulpitis irreversible no tratada, o de alguna lesión traumática que interrumpa la irrigación sanguínea de la pulpa. En la muerte pulpar termina todos los procesos metabólicos de esta y con pérdida de su estructura.¹⁵

3.2.4 Inflamación periapical

Inicia antes de que la pulpa sufra una necrosis total; se produce una reacción inflamatoria crónica, desde los vasos sanguíneos del ligamento periodontal, causado por la diseminación de productos bacterianos, mediadores de la inflamación y el tejido pulpar en vías de degeneración, que atraviesan el foramen apical.¹⁵

Alrededor del foramen aparece un proceso inflamatorio crónico, el tejido óseo se reabsorbe por presencia de los osteoclastos, también aparece tejido de granulación y formación de neovascularización.¹⁵

Patología periapical

Se clasifican en alteraciones periapicales agudas y crónicas.

Alteraciones periapicales agudas:

a) Periodontitis apical aguda: es la extensión de la inflamación pulpar hacia los tejidos perirradiculares. Además de una inflamación aguda alrededor del ápice y es generalmente muy dolorosa.¹⁵

Las causas generalmente se deben a mediadores inflamatorios de una pulpitis irreversible, toxinas bacterianas de pulpas necróticas, irritantes usadas en endodoncia, invasión de materiales de obturación endodóntica, restauraciones en hiperoclusión.¹⁵

b) Absceso apical agudo: lesión localizada o difusa de licuefacción, que destruye tejidos perirradiculares y es una respuesta inflamatoria grave a los irritantes bacterianos. Hay formación purulenta en el hueso alveolar a nivel del foramen apical, e inflamación aguda de los tejidos periapicales.¹⁵

Alteraciones periapicales crónicas

a) Absceso apical crónico: es un proceso inflamatorio infeccioso de poca intensidad y larga duración, existe acumulación purulenta e inflamación de tejidos periapicales. Se produce como consecuencia a la muerte pulpar, seguida por la invasión de los tejidos periapicales por agentes de origen microbiano o productos tóxicos en descomposición pulpar. Generalmente están relacionados con un tratamiento de conducto deficiente.¹⁵

b) Granuloma apical: es una masa localizada de tejido inflamatorio crónico, debido a la transformación progresiva del tejido periapical y del hueso alveolar en tejido de granuloma, con la finalidad de formar una zona de contención biológica y reparar estructuras lesionadas.¹⁵

3.2.5 Revascularización

Es una nueva opción de tratamiento para dientes no vitales, que no han terminado su formación radicular, y consiste en esterilizar los conductos radiculares utilizando pastas antibióticas, para después inducir la formación de un coágulo sanguíneo, el cual proporcionará nuevas células, que regenerarán el tejido dentario, devolviendo la integridad estructural de las piezas dentarias, cierre apical, y su funcionalidad

^{14,15,24,25,40}

Si bien la revascularización de un diente necrótico con presencia de bacterias tiene un pronóstico menos favorable que uno libre de contaminantes, pero si se logra simular un ambiente parecido al de un diente avulsionado, situación que se consigue desinfectando eficazmente los canales radiculares, el tratamiento de revascularización podría resultar exitoso.^{14,15,24,40}

3.2.6 Descontaminación de canales radiculares

El primer paso fundamental para todo tratamiento endodóntico de canales radiculares infectados es la desinfección por medio de la utilización de sustancias químicas auxiliares y la instrumentación mecánica.^{10, 15}

3.2.6.1 Sustancias químicas auxiliares

Las sustancias químicas auxiliares más utilizadas actualmente son el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, siendo la primera de mayor aceptación mundial. De acuerdo a la literatura el hipoclorito presenta propiedades antibacterianas contra los principales patógenos endodónticos y en tratamientos endodónticos convencionales, pueden ser utilizados en concentraciones que varían de 0.5 a 6%. En la terapia de

revascularización pulpar, varios casos clínicos tienen demostrado, el empleo de esa sustancia en concentraciones variadas, siendo común su utilización principalmente en concentraciones elevadas variando de 2.5% a 6%, obteniéndose resultados clínicos satisfactorios. Con relación a la clorhexidina, los casos clínicos reportados de revascularización utilizan este irrigante en concentraciones de 2%. Estas sustancias no son biocompatibles, pudiendo inviabilizar las células tronco presentes en el tejido pulpar, impidiendo que estas se adhieran a la superficie dentaria intraradicular.^{10,15}

3.2.6.2 Medicación intraconducto

El proceso de revascularización pulpar es más favorable en ambiente libre de bacterias, así es necesario que el sistema de canales radiculares sea debidamente limpio y desinfectado. La infección presente en los sistemas de canales radiculares es polimicrobiano, siendo improbable e imposible que solo un antibiótico sea eficaz contra esas bacterias, convirtiéndolo en un ambiente estéril. Siendo así Hoshino et al.(1996), realizaron un estudio evaluando y comparando la acción de antibióticos empleados solos y asociados, sobre microorganismos presentes en dentina, pulpa dental y lesiones periapicales. Se observaron que la asociación de tres antibióticos (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) consiguió eliminar las bacterias presentes en la superficie de la dentina, e inclusive de las capas más profundas de dentina.^{10,}

14,15,40

A partir de estudios y casos clínicos sobre revascularización comenzaron a utilizar esta pasta antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y minociclina) como patrón de medicación intraconducto, consiguiendo un ambiente estéril en el interior del sistema de canales radiculares, permitiendo, de esta manera, que un nuevo tejido penetre y de continuidad al desenvolvimiento radicular.^{10,40}

A pesar que esta pasta muestra efectividad, presenta efectos colaterales como la posibilidad de oscurecimiento de la corona dentinaria debido a la presencia de la minociclina, un derivado semisintético de la tetraciclina que presenta efectividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. En la tentativa de disminuir esos efectos, algunos estudios sugieren disminuir el tiempo de aplicación de la pasta para prevenir la decoloración dental asociada a su uso. Aún no se sabe si disminuir el periodo de aplicación es suficiente para prevenir la decoloración, ya que después de las 24 de horas de la aplicación, ya se puede notar decoloración de la corona.^{10,14,15}

El desarrollo de la resistencia microbiana es otro factor relevante sobre la utilización de la pasta antibiótica, aunque, no existen estudios que comprueben que esta pasta cause resistencia bacteriana. Considerando los puntos negativos de la utilización de esta pasta, los investigadores han comenzado a investigar otras posibles medicaciones intraconducto, con propiedades antibacterianas, para obtener la desinfección del sistema de conductos radiculares.^{10,15}

3.2.6.2.1 Pastas antibióticas usadas en necrosis pulpar de dientes jóvenes

a) Pasta de hidróxido de calcio

Es una pasta hecha a base de hidróxido de calcio, que utiliza como solvente agua destilada u otro vehículo.

Propiedades

- Radiopacidad
- Capacidad antibacteriana
- Fácil manipulación
- Fácil colocación intraconducto
- Bajo índice de reacciones secundarias.

➤ Estabilidad física y química.

. Se ha demostrado su actividad inhibitoria frente a *Strptococcus mutans*, *Staphyloccocus aereus* y *Lactobacillus casei*, sin embargo otros estudios señalan su escasa efectividad antibacteriana, ubicándolo en el último lugar junto al hidróxido calcio puro.¹⁵

El hidróxido de calcio ha sido utilizado tradicionalmente en casos de apexificación, además de ser utilizado como medicación intraconducto, debido a la propiedad antibacteriana que posee, impidiendo la proliferación microbiana, por eso es investigado también el uso del hidróxido de calcio en el interior de conducto radicular, en los casos de revascularización pulpar, siendo observado en casos clínicos con éxito clínico y radiográfico. Ese resultado puede ser justificado, ya que las investigaciones demuestran que el hidróxido de calcio es capaz de solubilizar moléculas bioactivas, inclusive los factores de crecimiento de la matriz dentinaria, y pueden estimular a células pulpares indiferenciadas a que se diferencien a células semejantes a los odontoblastos, produciendo un tejido similar a la dentina.^{15,40}

En casos de revascularización pulpar generalmente son realizados en dos sesiones. En la primera sesión se realiza la limpieza del sistema de conductos radiculares, a través de irrigación abundante con alguna sustancia química auxiliar, e inmediatamente se coloca la medicación intraconducto, que permanece aproximadamente por tres semanas. En la segunda sesión se induce al sangrado en el interior del conducto, el cual es sellado con MTA o materiales resinosos, los estudios demuestran que se obtiene éxito, consiguiendo el desenvolvimiento radicular y el engrosamiento de las paredes dentinarias.^{10,14,15,25,40}

b) Pasta Tri Mix

Durante los últimos años los estudios han demostrado que es capaz de eliminar los microorganismos de tejidos dentales infectados de dientes deciduos y permanentes.

Se ha demostrado su efectividad en tratamientos endodónticos en dientes permanentes, en casos de medicación intraconducto, retratamientos de infecciones por *Enterococcus faecalis* o infecciones periapicales crónicas.^{10,15,40}

Componentes

Consta de dos partes, polvo y líquido. El polvo está conformado por una combinación de tres antibióticos, en una proporción de 1:1:1, de metronidazol, ciprofloxacino y minociclina; y la parte líquida conformada por una parte de macrogol y propylenglicol, actúan como vehículos transportadores de antibióticos.^{10,17}

Metronidazol

Presenta actividad in vitro contra alta variedad de parásitos protozoarios y bacterias anaerobias. Posee actividad antibacteriana contra cocos anaerobios, y bacilos Gram negativos anaerobios, incluidas especies de bacteroides y bacilos grampositivos esporógenos anaerobios, los bacilos grampositivos no esporulados son resistentes al igual que las bacterias anaerobias facultativas y las aerobias. Su uso está indicado en infecciones anaerobias y parasitarias.^{13,17,33,35}

El metronidazol inhibe la síntesis de ácidos nucleicos en microorganismos obligadamente anaerobios, independiente de la fase de crecimiento bacteriano. Se absorbe el 80% por vía oral. Su tiempo de vida media es de 8 horas, se metaboliza en el hígado, el 60 % a 80% se elimina por vía renal, la mitad como metronidazol y la otra mitad como metabolitos. Entre sus efectos adversos los más comunes son cefaleas, náuseas, xerostomías, y sabor metálico, a veces surge molestias como vómitos, diarreas, y molestias abdominales.^{10, 13,17,32,33,35}

Ciprofloxacino

Es una quinolona de segundo grado, estos ejercen un efecto bactericida, por inhibición selectiva de la síntesis de ADN en la bacteria, inhibiendo a la ADN girasa, de

transcripción, recombinación y transposición. La vida media plasmática es de 3 a 5 horas, se absorbe adecuadamente después de ingerirla, entre sus aplicaciones terapéuticas.^{10,13,17,32,33,36}

Se considera: infecciones de vías urinarias, enfermedades venéreas, infecciones del tubo digestivo y abdomen, infecciones de hueso, articulaciones, y tejidos blandos, entre otras. Las reacciones adversas son bien toleradas, la ciprofloxacino posee efectividad contra enterobacterias como *E. coli*, *Kelibsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Proteus*.^{10, 13,17,33}

Entre los grampositivos se destaca la acción contra *Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*.^{10,13,17.36}

El ciprofloxacino ha sido utilizado en infecciones periapicales refractarias al tratamientos endodónticos, la elevada incidencia de *Pseudomona aeruginosa* en estas lesiones periapicales recidivantes y la resistencia mostrada frente la penicilina, carbenicilina y metronidazol motivaron el uso del ciprofloxacino de manera exitosa, obteniendo resultados similares frente a *Enterobacter*, *Acitenobacter* y *Kleibsell*.^{10,13,17.36}

Minociclina

Son antibióticos bacteriostáticos de amplio espectro, actúan contra una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas anaerobias y aerobias, son eficaces contra algunos microorganismos resistentes a antibacterianos activos contra la pared bacteriana.^{10, 13,17,32,33,35}

Las tetraciclinas son activas contra muchos microorganismos anaerobios y facultativos, tiene actividad contra *Actinomyces*, los tratamientos prolongados con tetraciclina facilitan el desarrollo de cepas resistentes a estos antibióticos, sobretodo Gram positivas, después de cuatro semanas de tratamiento, su tiempo de vida es de

15 a 20 horas, se indica en infecciones diversas, sobretodo infecciones de piel y de tejido blando.^{10, 13,17,33,35}

El uso prolongado de tetraciclinas, puede causar efectos contra hueso y tejido dentario, y se depositan especialmente en tejidos e imprimen un color marrón a los dientes.

Otra característica es que se deposita en los huesos en embarazadas y en infantes, habiéndose demostrado una depresión del 40 % del crecimiento óseo, en niños prematuros tratados con estos agentes, por eso, no se recomienda su uso en niños, menores de 8 años de edad.^{15,17,33,35}

Propylen- glicol

Es un líquido incoloro, viscoso e higroscópico, esta sustancia se utiliza como solvente en muchos fármacos, cosméticos, lesiones, ungüentos, etc.

Está implicado en dermatitis por contacto, daño en el riñón y anormalidades en el hígado, puede dañar membranas celulares, causando irritación o sarpullido, piel seca y daño en la superficie. Tiene capacidad de penetrar en la dentina más rápida y efectivamente que el agua destilada, por lo que se considera un vehículo eficaz para la distribución de medicamentos dentro de conductos radiculares.¹⁰

Macrogol

Se utiliza como vehículo en farmacología dermatológica, su consistencia varia conforme la longitud de la cadena, es altamente soluble en agua, y en alcohol, éter, aceites esenciales y minerales. Muestra excelente lubricación, se descompone en altas temperaturas y no deja residuos.¹⁰

Preparación de pasta antibiótica triple

Se recomienda que esta pasta se prepare el mismo día del tratamiento. Para su preparación los medicamentos se adquirirán en su forma comercial, se debe tener en cuenta la consistencia y la proporción adecuada.¹⁰

Para eso se necesita tres recipientes con los medicamentos pulverizados (se retirará la cubierta, porque es azucarada) y un cuarto recipiente para preparar la pasta.¹⁰

- Con una espátula, tomar el metronidazol 500mg y colocar en una platina.
- Con una espátula, tomar la misma proporción de ciprofloxacino 500mg y colocarlo en la platina.
- Tomar la misma proporción de minociclina 100mg y colocarlo en la platina.
- Finalmente mezclar los tres componentes.¹⁰

METRONIDAZOL: CIPROFLOXACINO: MINOCICLINA=1:1:1 1:1:1 (MCH)

En otra platina mezclar en el mismo volumen de Propylen glicol y Macrogol, mezclar bien hasta formar una textura cremosa.¹⁰

Propylen glicol: Macrogol= 1:1

Y finalmente para la preparación final de la pasta antibiótica triple se mezclará una parte de PM y siete partes de MCH.¹⁰

3.3 Definición de términos

1. **Efecto antibacteriano:** cualidad de un fármaco o agente químico determinado, que inhibe el crecimiento, reproducción o destruye la bacteria en un medio dado. Es la relación entre CBM/CIM. CBM/CIM=1 bactericida, CBM/CIM>4 bacteriostático.

2. **CIM: concentración mínima inhibitoria**, es la menor concentración que inhibe completamente el crecimiento bacteriano visible, después de 18 – 24 horas de incubación con un inóculo estándar de 10⁵ ufc/ml.

3. **CBM: concentración mínima bactericida**, es la menor concentración de antibiótico que mata el 99.9% del inóculo.

4. **Bactericida:** sustancia que lisa o destruye la bacteria.

5. **Bacteriostático:** sustancia que restringe el desarrollo y reproducción de una bacteria.

6. **Bacterias anaerobias estrictas:** bacterias que no sobreviven y no se desarrollan en ambientes que contienen oxígeno molecular; ya que les resulta tóxico, producen poca energía por respiración anaerobia, por lo que degradan proteínas y amino ácidos, para obtener energía adicional.

7. **Bacterias anaerobias facultativas:** bacterias que se desarrollan en presencia y en ausencia de oxígeno atmosférico.

3.4 Hipótesis y variables

3.4.1 Hipótesis

La pasta Tri mix presenta mejor efectividad antibacteriana *in vitro* contra *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* en comparación a la pasta de hidróxido de calcio.

3.4.2 Variables

a) Variable independiente:

Tipo de medicación intraconducto

- Pasta Tri mix (Metronidazol, ciprofloxacino y minociclina)
- Pasta de hidróxido de calcio (control positivo).
- Agua destilada (control negativo).

b) Variable dependiente:

Efectividad antibacteriana in vitro sobre

- *Actinomices odontolyticus* (bacteria anaerobia facultativa).
- *Porphyromona gingivalis* (bacteria anaerobia estricta).

3.5 Operacionalización de variables

Variables	Definición	Dimensión	Indicador	Escala	Categoría
<i>Tipo de medicación intraconducto (variable independiente)</i>	<i>Pasta de medicación intraconducto usados en tratamientos de revascularización</i>	Componentes de la pasta Tri mix:	Presencia o ausencia de cada uno de los componentes	<i>Nominal</i>	<i>Pasta Tri mix</i>
		Metronidazol		<i>Si</i>	
		Ciprofloxacino		<i>No</i>	
		Minociclina			
		Componentes de la pasta hidróxido de calcio:		<i>Si</i>	<i>Pasta de hidróxido de calcio</i>
		Hidróxido de calcio		<i>No</i>	
				<i>Si</i>	<i>Placebo</i>
				<i>No</i>	
<i>Efectividad antibacteriano (variable dependiente)</i>	<i>Capacidad de la medicación intraconducto de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano in vitro de:</i> <i>Actynomices odontolyticus (bacteria anaerobia facultativa)</i> <i>Porphyromona gingivalis (bacteria anaerobia estricta)</i>	Efecto antibacteriano in vitro para <i>Actynomices odontolyticus</i>	Halos de inhibición de crecimiento bacteriano medidos en mm formados por acción de la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio.	<i>Cuantitativa Numeral Tri mix</i>	<i>Susceptible (Mayor 25 mm)</i> <i>No susceptible (Menor 25 mm)</i>
				<i>Hidróxido de calcio</i>	<i>Susceptible (Mayor 10 mm)</i> <i>No susceptible (Menor 10 mm)</i>
		Efecto antibacteriano in vitro para <i>Porphyromona gingivalis</i>		<i>Tri mix</i>	<i>Susceptible (Mayor 30 mm)</i> <i>No susceptible (Menor 30 mm)</i>
				<i>Hidróxido de calcio</i>	<i>Susceptible (Mayor 10 mm)</i> <i>No susceptible (Menor 10 mm)</i>

IV DISEÑO METODOLOGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

De tipo experimental in vitro, prospectivo y longitudinal.

4.1.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACION

Experimental porque se determinó el comportamiento de las bacterias ATCC^R *Actinomices odontolyticus* (ATCC^R 25586) y *Porphyromona gingivalis* (ATCC^R 33277), in vitro, frente a la combinación de los antibióticos de la pasta Tri mix, de hidróxido de calcio 20 % (control positivo) y agua destilada (control negativo), es decir se manipularon las condiciones de la investigación y se contó con un grupo control, asimismo se estableció una asociación entre los resultados.

Ensayo experimental controlado se empleó la pasta de hidróxido de calcio al 20 % como control positivo y agua destilada como control negativo.

1. In vitro porque se trabajó con cepas de bacterias ATCC^R y se llevó a cabo en un laboratorio de microbiología.

2. Prospectiva porque la información fue registrada conforme fueron ocurriendo los hechos.

3. Longitudinal porque las variables de estudio fueron observadas a lo largo de un tiempo determinado. Se realizó controles a la semana para *Actinomyces odontolyticus* y a los 20 días para *Porphyromona gingivalis*.

4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

4.2.1 Universo o población

Las bacterias *Actinomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

4.2.2 Tamaño total de la muestra

La muestra fue elegida al azar de una cepa ATCC^R de *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

4.2.3 Tipo de muestreo

Muestreo probabilístico por conveniencia.

4.2.4 Unidad de análisis

Cepas de bacterias (ATCC^R) *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* (Laboratorio Gen Lab).

4.2.5 Criterios de inclusión

- Bacterias *Actynomices odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* obtenidas en forma de cultivo de cepas ATCC^R.
- Bacterias que no presenten contaminación por agentes externos del medio ambiente.
- Bacterias reportadas como agente etiológico de necrosis pulpar.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Procedimientos y técnicas

OBTENCION DE LA MEDICACION INTRACONDUCTO

Obtención de la pasta intraconducto de hidróxido de calcio

Para la preparación de la pasta de hidróxido de calcio a una concentración de 20 %, se utilizó 20 gr de hidróxido de calcio puro como soluto, la cual se disolvió en agua destilada hasta obtener 100ml de solución.

Pasta experimental tri antibiótica

Para la preparación de la pasta Tri mix, se empleó solución de metronidazol 8 ug/ml, ciprofloxacino 4 ug/ ml y minociclina 4 ug/ ml, todas fueron estrictamente pesadas en una balanza electrónica de precisión en la misma proporción y disueltas en agua destilada.

PRUEBA EXPERIMENTAL

Adquisición de la muestra

Se usaron 2 muestras de cepas bacterianas ATCC (bacterias anaerobias estrictas y facultativas), identificadas por género y especie, obtenidas del Laboratorio Gen Lab.

Actinomyces odontolyticus ATCC® 25586.

Porphyromona gingivalis ATCC® 33277.

Preparación de pasta Tri mix

La pasta Tri mix se preparó empleando solución de ciprofloxacino 4 ug/ml, metronidazol 8 ug/ml y minociclina 4ug/ml. Todas las cantidades fueron estrictamente pesadas en la misma proporción (hasta 0.001 gr) en una balanza electrónica de

precisión. Posteriormente fueron incorporados los tres antibióticos, en la misma proporción 1:1:1, en una platina de vidrio con agua destilada, utilizada como solvente.

Concentraciones Inhibitorias Mínimas **CIM que se empleará según Clinical and Laboratory Standards Institute**

Se empleó las Concentraciones Inhibitorias Mínimas al 90 %, con el objetivo de observar una mayor inhibición de crecimiento bacteriano. Las cantidades a utilizar fueron extraídas de las tablas Standard de Susceptibilidad Antibiótica establecidas en los documentos M11- A7 y M-100 S14 del Clinical and Laboratory Standards Institute para microorganismos anaerobios estrictos y facultativos.

Para *Actinomyces odontolyticus* ATCC® 25586 y *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277 la concentración que se utilizaron fueron:

- Metronidazol 8 ug/ml
- Ciprofloxacino 4 ug/ml
- Minociclina 4 ug/ml.

Obtención de la solución de hidróxido de calcio.

La solución de hidróxido de calcio se preparó a una concentración de 20 %. Se utilizó 20 g de hidróxido de calcio puro como soluto y se disolvió en agua destilada hasta alcanzar 100 ml de solución.

Prueba de Susceptibilidad Antibiótica. Método de difusión en pozos.

Activación de las cepas

Las cepas ATCC® se mantuvieron en condiciones de refrigeración (2-8 °C) desde el día de la adquisición de las cepas hasta el día de la reactivación de las mismas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las cepas fueron retiradas de su envase y sembradas en una placa que contenía el medio de cultivo enriquecido Agar Shadler, en condiciones de anaerobiosis, colocándolos en una jarra de anaerobiosis, hasta comprobarse la reactivación de las cepas en una semana para *Actinomyces odontolyticus* y 20 días para *Porphyromona gingivalis*.

Prueba de Susceptibilidad Antibiótica

Después de obtener las bacterias reactivadas, se procedió a sembrar cada una de las especies bacterianas en placas Petri (por triplicado) *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* en condiciones de anaerobiosis. Al mismo tiempo se realizó la prueba de susceptibilidad de la pasta Tri mix y de hidróxido de calcio al 20%, utilizando el Método de Difusión en Pozos.

- Se extrajo con un asa de siembra 3 a 4 colonias de cada cepa reactivada y se inoculó en agua destilada estéril (5ml) por separado, hasta obtener una turbidez de 1,5 en la escala Mc Farland de cada cepa.
- Posteriormente con un hisopo estéril se embebió la suspensión mencionada y se procedió a realizar la siembra por disseminación. Las cepas *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis* fueron sembradas en Agar Schadler suplementado con sangre de cordero.
- Luego cada una de las dos especies bacterianas, fueron sembradas por triplicado, y finalmente se obtuvo 6 placas Petri.
- Después se dejaron secar de 2 a 3 minutos.

- Luego se procedió realizar los tres pozos presionando firmemente sobre el Agar, a una distancia de 1,5 cm del borde de la placa, y a una distancia no menor de 15 mm entre pozo y pozo.
- Posteriormente se utilizó una jeringa para depositar 1 ml de la pasta Tri mix, pasta hidróxido de calcio (control positivo) y suero fisiológico (control negativo) en cada pozo respectivamente.
- Luego se procedió a transportar dichas placas Petri en una jarra de anaerobiosis, luego se colocaron en una estufa a 37 °C durante una semana para *Actinomyces odontolyticus* y 20 días para *Porphyromona gingivalis*.
- Los halos de inhibición se formaron después de una semana de realizar el cultivo para *Actinomyces odontolyticus* y 20 días para *Porphyromona gingivalis*, y fueron medidos con una regla vernier sobre la superficie de la placa Petri.
- Finalmente se comparó la medida de los diámetros de los halos de inhibición y se determinó que pasta tiene mayor efectividad antibacteriana frente *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

4.4 RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizó la ficha de recolección de datos (ver anexo 1) en la cual se anotaron los resultados obtenidos de la prueba de susceptibilidad antibiótica; a través de la medición en milímetros de los halos de inhibición, utilizando una regla vernier calibrada sobre el crecimiento bacteriano alrededor del pozo. El diámetro de la zona de inhibición fue directamente proporcional a la efectividad antibacteriana de las respectivas soluciones.

4.5 PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa estadístico SPSS versión 17.0. Se presentan en gráficos y cuadros estadísticos, para poder ser analizados; establecer las diferencias en los halos de inhibición, según la prueba utilizada y

determinar estadísticamente la efectividad antibacteriana para cada pasta. Para la comparación de los halos de inhibición formados por las pastas se utilizó la Prueba *T* Student tanto para muestras independientes como dependientes (comparación de los halos en cada control) y Prueba Anova One Way.

V.RESULTADOS

Para evaluar la efectividad antibacteriana in vitro de las dos pastas de medicación intraconducto se utilizaron dos cepas bacterianas (anaerobia estricta y anaerobia facultativa) adquiridas de los laboratorios Gen Lab:

- *Actinomyces odontolyticus* (ATCC 25586)
- *Porphyromona gingivalis* (ATCC 33277)

Las bacterias fueron reactivadas in vitro en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM90) que se emplearon fueron tomadas del CLSI (**Clinical and Laboratory Standards Institute**) las cuales tuvieron que ser reajustadas para adaptarse al presente trabajo de investigación.

Se realizó la prueba de susceptibilidad para las dos cepas reactivadas, pero para los fines estadísticos sólo se consideró la cepa de *Actinomyces Odontolyticus*, ya que la bacteria *Porphyromona gingivalis* no pudo ser analizada bajo los criterios de medición.

CUADRO 1. EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LA PASTA TRI MIX Y DE LA PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO FRENTE A *Actinomyces odontolyticus* (1 semana)

Solución	Placa 1	Placa 2	Placa3
	(mm)	(mm)	(mm)
Tri mix	34	38	38
Hidróxido de calcio	26	22	21
Agua destilada	6	6	6

Solución	Promedio	Mediana	Moda	Desviación Estándar	Varianza
Tri Mix	37	38	38	2.31	5
Hidróxido de calcio	23	22	22	2.65	7
Agua destilada	6	6	6	0	0

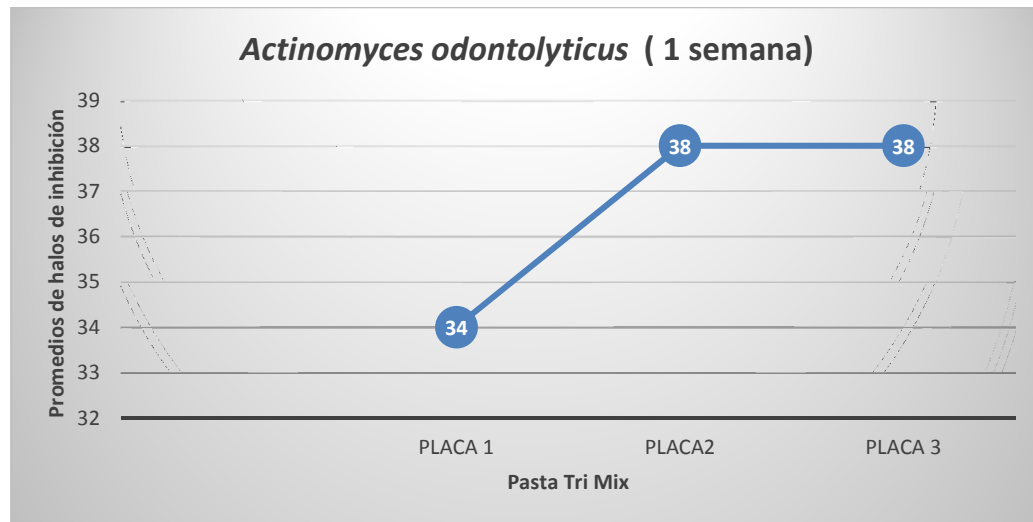
p<0.022 según la Prueba estadística Anova One – Way

Presenta la efectividad antibacteriana *in vitro* de la pasta Tri mix e hidróxido de calcio frente la bacteria anaerobia facultativa *Actinomyces odontolyticus* después de una semana de realizada la prueba de susceptibilidad. Los mayores promedios de diámetros de halos de inhibición están dados por la acción de la pasta Tri mix (37 mm) frente a la de hidróxido de calcio (23 mm). Se realizó la prueba estadística Anova One - Way considerando los dos grupos de pastas de medicación intraconducto y la solución control (Control-negativo: Agua destilada) obteniendo como resultado un valor. $p < 0.05$ (estadísticamente significativo). La prueba T realizada para comparar los halos de inhibición entre pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio dio como resultado $p = 0.022$ ($p < 0.05$), es decir, esta diferencia fue estadísticamente significativa.

EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LA PASTA TRI MIX Y DE LA PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO FRENTE *Porphyromona gingivalis*.

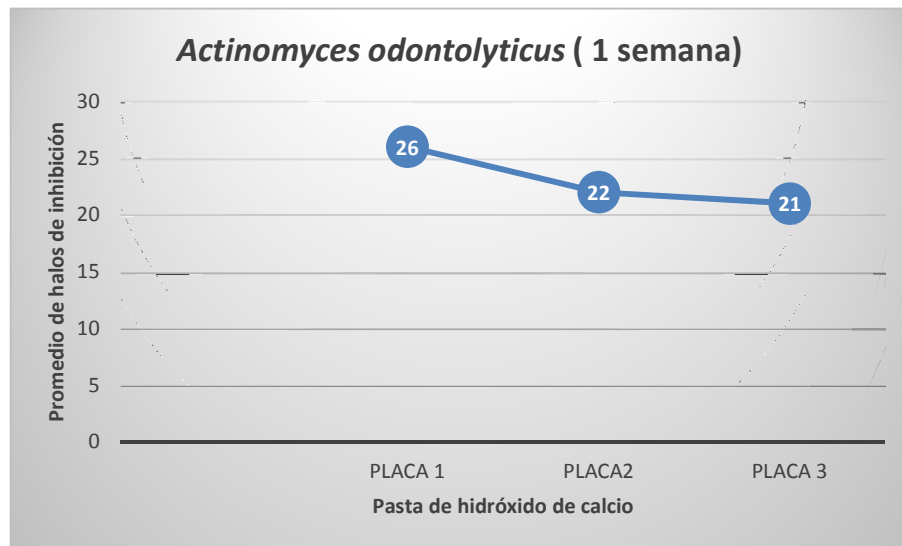
Presenta la efectividad antibacteriana *in vitro* de la pasta Tri mix e hidróxido de calcio frente la bacteria anaerobia estricta *Porphyromona gingivalis* a los 20 días de realizada la prueba de susceptibilidad. No se pudo registrar la medición de los halos de inhibición debido a que estos confluyeron entre sí e inhibieron en su totalidad el crecimiento bacteriano. Las pruebas de One- way y T – Student, así como las mediciones de tendencia central no pudieron realizarse debido a la ausencia de datos.

Grafico 1. Efectividad antibacteriana *in vitro* de la pasta Tri mix frente a *Actinomyces odontolyticus* (1 semana)



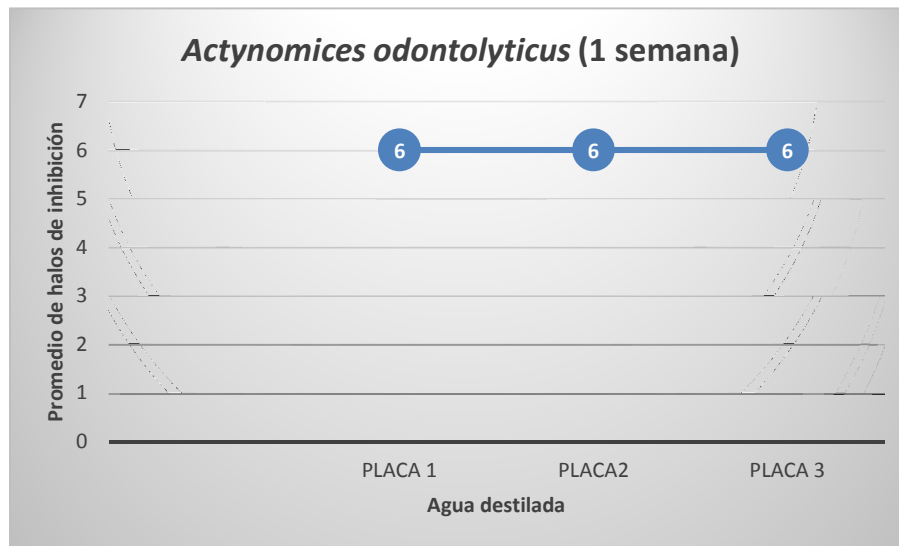
El gráfico muestra las mediciones en mm de los halos de inhibición obtenidos a una semana de realizar la prueba de susceptibilidad de la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente la acción de la pasta Tri mix. Se observa que el valor más alto de halo de inhibición que se obtuvo fue de 38 mm, obtenido en la placa 2 y placa 3.

Grafico 2. Efectividad antibacteriana *in vitro* de la pasta de hidróxido de calcio frente a *Actinomyces odontolyticus* (una semana).



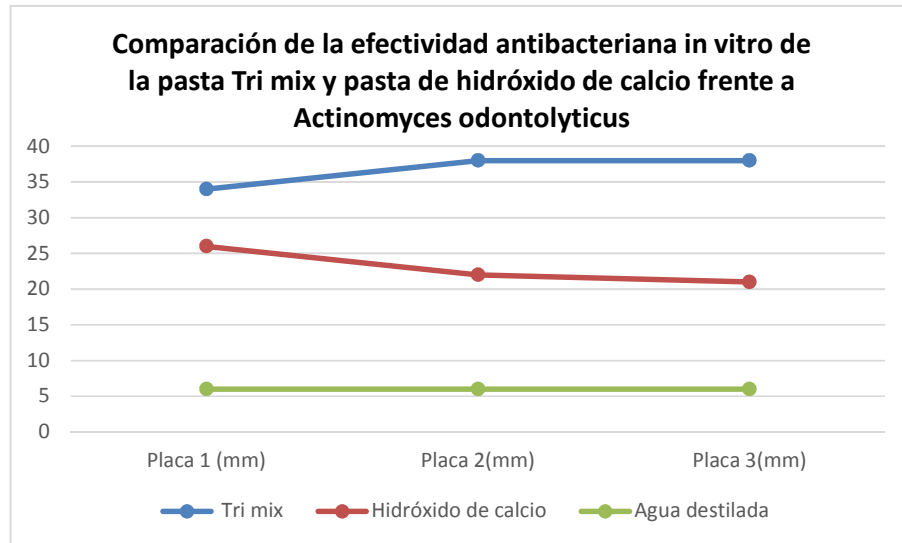
El gráfico muestra las mediciones en mm de los halos de inhibición obtenidos a una semana de realizar la prueba de susceptibilidad de la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente la acción de la solución de hidróxido de calcio. Se observa que el valor más alto de halo de inhibición que se obtuvo fue de 26 mm, obtenido en la placa 1.

Grafico 3. Efectividad antibacteriana de agua destilada frente a *Actinomyces odontolyticus*.



El gráfico muestra las mediciones en mm de los halos de inhibición obtenidos a una semana de realizar la prueba de susceptibilidad de la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente la acción de agua destilada. Se observa que 6 mm es el halo de inhibición observado en las tres placas.

Grafico 4. Comparación de la efectividad antibacteriana de las pastas de medicación intraconducto frente a *Actinomyces odontolyticus* (una semana)



El gráfico muestra la comparación de las mediciones (en mm) de los halos de inhibición obtenidos en la placa 1, placa 2, placa 3; a una semana de realizar la prueba de susceptibilidad de la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente la acción de la pasta Tri mix y la pasta de hidróxido de calcio. Se observa que el valor más alto de halo de inhibición se obtuvo por acción de la pasta Tri mix (37 mm), que fue superior en comparación con el valor más alto alcanzado por la pasta de hidróxido de calcio (26mm) y agua destilada (6mm) respectivamente. El mínimo valor de halo de inhibición formado fue dada por la acción de la pasta de hidróxido. El agua destilada no formó halos de inhibición.

VI. DISCUSIÓN

Los dientes jóvenes con necrosis pulpar tienen una etiología polimicrobiana, con predominio de bacterias anaerobias estrictas sobre facultativas, presentan raíces con desarrollo incompleto y de paredes delgadas que imposibilita realizar una preparación biomecánica exhaustiva, por ello estos dientes deben tratarse con medicación intraconducto. En la actualidad está documentado que las bacterias son predominantes en cavidad bucal; se calcula que existen 10.000 millones de células bacterianas, y de 10 a 20 géneros por conducto radicular infectado. Investigaciones actuales realizadas por Lana ⁶(2001) que analizó 31 conductos radiculares diagnosticadas con necrosis pulpar, encontró que las bacterias anaerobias estrictas halladas fueron de 80% de los casos, las bacterias anaerobias facultativas en 51%, y las especies microaerófilas en un 18.5 %. Siqueira (2008) y Rocas¹⁸ (2008) detectan especies con mayor frecuencia que pertenecen a los géneros de bacterias gramnegativas (*Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* y *Veillonella*) y grampositivas (*Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*) más prevalentes en dientes necróticos, asimismo Aas ³⁷(2005) detectó que en dientes permanentes con infección primaria especies con mayor frecuencia de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Spirochaetes* , *Candida albicans*, *Campylobacter* y *Actinomyces*.

La bacteria *Actinomyces odontolyticus*, es una de las bacterias más prevalente en necrosis pulpar, según confirma la investigación de Muñante⁵(2005). En nuestra investigación, se confirmó la susceptibilidad de *Actinomyces odontolyticus* frente a la pasta Tri mix a los 7 días de realizada la prueba, formando halos de inhibición de 37 mm promedio, que coincide con los resultados obtenidos en las investigaciones de

Quispe ¹⁰(2007), que demostró la susceptibilidad de la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente a pasta Tri mix , formando halos de inhibición 28 mm promedio.

La bacteria *Porphyromona gingivalis* es la bacteria anaerobia más prevalente en necrosis pulpar y lesiones periapicales, según confirman los trabajos de investigación realizadas por Rocas ¹⁸(2004). En nuestra investigación, en la prueba de susceptibilidad a la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio frente *Porphyromonas gingivalis* no se observaron la formación de halos de inhibición; pues se encontró una alta sensibilidad a dichas pastas inhibiéndose completamente el crecimiento bacteriano al igual de los resultados obtenidos en la investigación de Quispe¹⁰ (2007), que comprobó la susceptibilidad de la bacteria *Porphyromona gingivalis* frente a la pasta Tri mix, metronidazol, ciprofloxacino y minociclina, que no se observaron la formación de halos de inhibición, ya que estos confluyeron entre sí, debido a la alta sensibilidad de dicha bacteria frente a dichos antibióticos.

Para la prueba de susceptibilidad de la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio se empleó el Método Modificado en Pozos, a diferencia de las investigaciones realizadas por Windley ⁴(2005) que empleó el método Model D Spiral para demostrar la efectividad antibacteriana de la combinación de tres antibióticos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina frente a *Porphyromona gingivalis* en dientes inmaduros, asimismo Sato⁹, Hoshino⁸ (2005) emplearon otro método, el método de Dilución en Agar y Quispe¹⁰ (2007) utilizó el método de Método de difusión en discos, para probar la combinación de tres antibióticos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina frente a bacterias anaerobias estrictas y facultativas más representativas en necrosis pulpar. , en este trabajo de investigación se empleó el Método Modificado en Pozos debido a que las pastas que se utilizaron en esta investigación fueron muy densas y no difundirían adecuadamente si se empleara discos. Con el Método Modificado en pozos que empleamos en esta investigación obtuvimos la formación de halos de inhibición

grandes a comparación de los estudios antes mencionados. Esto coincide con los estudios realizados por ROJAS⁸ (2004) que evaluó y comparó el método de difusión en pozos y el método de Kirby-Bauer(método de difusión en discos), los resultados mostraron que el método de pozos fue mucho más sensible que el método de Kirby Bauer para determinar la efectividad antibacteriana .

En nuestra investigación utilizamos Concentraciones Inhibitorias Mínimas CIM que se emplearon según Clinical and Laboratory Standards Institute, Metronidazol 8 ug/ml , Ciprofloxacino 4 ug/ml, Minociclina 4 ug/ml, que coincide con la concentración de ciprofloxacino, pero difiere con la concentración para metronidazol hallada en los estudios de Carreira⁴¹ (2007) que determinó el CIM de ciprofloxacino y metronidazol a diferentes concentraciones y combinaciones frente a bacterias aerobias, anaerobias facultativas. La concentración mínima inhibitoria hallada para el ciprofloxacino fue 4 ug/ml y para el metronidazol 16 ug/ml.

Sato⁹, Hoshino⁸ (2005) y Quispe ¹⁰(2007) realizaron investigaciones sobre el tema y demostraron la efectividad antibacteriana de la combinación de los tres antibióticos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina frente a bacterias más frecuentes en conductos radiculares infectados que coinciden con el presente estudio donde se confirma la efectividad antibacteriana de la combinación de tres antibióticos ciprofloxacino, metronidazol y minociclina contra *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

Los resultados de la prueba de susceptibilidad para la pasta de hidróxido de calcio al 20% frente a *Actinomyces odontolyticus* evidenciaron la formación de halos de inhibición de 23 mm (promedio), mientras que frente a *Porphyromona gingivalis*, no se evidenciaron la formación de halos de inhibición, lo que coincide con los estudios realizados por Gangwar (2011) quien determinó la efectividad antibacteriana de pastas a base de hidróxido calcio frente *S. aureus* y *E. faecalis*, una a base de

hidróxido de calcio con paramonoclorofenol alcanforado, la cual mostró la formación de halos de inhibición de 20 a 25 mm a comparación de la pasta a base de hidróxido de calcio con solución salina, la cual mostró la formación de halos de inhibición de 10 a 15mm. Ambas pastas mostraron inhibición de crecimiento bacteriano, pero se encontró que frente a *S. aureus* mostró máxima inhibición de crecimiento bacteriano, mientras que frente *E. faecalis* la inhibición bacteriana fue mínima, lo cual demuestra que la efectividad bacteriana de la pasta antibacteriana también depende de la sensibilidad de la bacteria.

Ferreira ²⁰(1978) determinó que la concentración al 5%, 10% y 20% de la pasta de hidróxido de calcio, es un factor influyente, siendo inversamente proporcional al tiempo de contacto con las bacterias, produciendo en consecuencia un efecto bacteriostático y bactericida. En nuestra investigación se preparó la pasta de hidróxido al 20% y se utilizó como solvente el agua destilada. La pasta de hidróxido de calcio al 20% mostró efectividad antimicrobiana frente a *Actinomyces odontolyticus* formando halos de inhibición de 23 mm en promedio.

VII. CONCLUSIONES

- La pasta Tri mix presenta mayor efectividad antibacteriana in vitro que la pasta de hidróxido de calcio al 20 % frente a *Actinomyces odontolyticus*.
- La pasta Tri mix presenta efectividad antibacteriana frente a *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.
- La solución de hidróxido de calcio al 20% presenta efectividad antibacteriana frente a *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.
- La bacteria *Porphyromona gingivalis* es más sensible que la bacteria *Actinomyces odontolyticus* frente a la pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio.
- El agua destilada no presenta efectividad antibacteriana.

VIII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la sensibilidad de la combinación de las drogas de la pasta Tri mix frente a otras bacterias anaerobias estrictas y facultativas representativas y prevalentes en dientes jóvenes con necrosis pulpar.
- Realizar estudios comparativos similares utilizando otro de tipo de pastas de medicación intraconducto utilizados en tratamientos de revascularización.
- Realizar estudios de investigación similares utilizando otros métodos microbiológicos con la finalidad de comparar los resultados con las de esta investigación.
- Trabajar la inoculación de pastas de medicación intraconducto en las siembras utilizando solo una pasta de medicación intraconducto por placa Petri, ya que generalmente estas forman amplios diámetros de halos de inhibición.
- Evaluar la sensibilidad de la combinación de la pasta Tri mix en bacterias aisladas de pacientes con dientes jóvenes diagnosticados clínica y radiográficamente con necrosis pulpar.
- Realizar estudios similares evaluando la efectividad antibacteriana de la pasta Tri mix in vivo, en pacientes que presenten dientes jóvenes con necrosis pulpar.
- Realizar estudios *in vitro* evaluando la efectividad de la pasta Tri mix como medicación intraconducto en dientes permanentes que recibirán tratamiento endodóntico.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GANGWAR, A. Antimicrobial effectiveness of different preparations of calcium hydroxide. Indian Journal of Dental. Vol 22, N° 1, p 66-70, 2011.
2. SATO T., et al. Sterilization of infected root- canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. International Endodontic Journal. Vol 29, N° 2, p. 118-124, 1996.
3. NANDA R, et al. Clinical evaluation of 3 Mix and Other Mix in non instrumental endodontic treatment of necrosed primary teeth. Journal of oral biology and craniofacial research. Vol 4, N° 2, p 114-119, 2014.
4. WINDLEY W., et al. Desinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. Journal of Endodontics. Vol, 31, N° 6, p 439-443, 2005.
5. MUÑANTE CARDENAS, José Luis. Identificación de microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos frecuentes en necrosis pulpares. Tesis para obtener título de Cirujano Dentista. Lima. Perú. 2005.
6. Lana M., et al. Microorganism isolated from root Canals presenting necrotic pulp and their drugs susceptibility in Vitro. Oral Microbiology Immunology. Vol 16, pag 100-105, 2001,
7. T.TAKUSHIGE, E.HOSHINO. Clinical evaluation of LSTR 3 MIX- MP. Therapy for perforated roots. Niigata Univ. Niigata. Japan 2001.

<http://iadr.confex.com/iadr/2001chiba/scheduler/schedulerpaper.cgi?abstract=4345>
8. ROJAS J., et al. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, España y Portugal, Vol 4, N° 2, p 28-32, 2005.
9. HOSHINO E., et al. In vitro antimicrobial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. International Endodontic Journal, Vol. 29, N° 2, p. 125 -130, 1996.
10. SATO T., et al. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. Oral Microbiology Immunology, Vol 8, N°3, p 172-176, junio 1993.
11. QUISPE SALCEDO, Angela. Evaluación del efecto antimicrobiano de pasta trimix en bacterias anaerobias prevalentes en necrosis pulpar. Tesis para obtener título de Cirujano Dentista. Lima. Perú. 2007.

12. NEGRONI, Martha. Microbiología Estomatológica. Fundamentos y Guía Práctica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 1998.
13. LIEBANA UREÑA, José. Microbiología Oral. Editorial Mc. Graw Hill. Primera Edición. Madrid. España. 1995.
14. HARDMAN JOLL, G., LIMBARD LEE, E., GOODMAN GILMAN, A. Goodman y Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ma. Edición. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México D.F. México. 2001.
15. PEDROSA DE ALBURQUERQUE, Maria Teresa. Protocolos de revascularización pulpar. Tesis para obtener título de especialista en Endodoncia. Piracicaba. Brasil. 2012.
16. COHEN, S; HARGREAVES K .Vías de la pulpa, editorial EdiDe, Décima Edición, Barcelona, España, 2011.
17. ERCAN E, DALLI M, et al. Investigation of Microorganism in Infected dental roots Canals. Biotechnol Eq, vol 2, N° 20, p. 166-172, 2006.
18. ALVARADO ALVA, Juan C. Antibióticos quimioterapicos. Primera edición. Apuntes médicos del Perú. Lima. Perú. 1999.
19. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Dtection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses, FEMS Microbiol Lett. p 250-279, 2005.
20. TRONSTAD D., et al. Microbiological monitoring and results of treatment of extraradicular endodontic infection. End. Dent. Traumat. Vol 6, N°3, p 129-136, June, 1990.
21. FERREIRA A., et al. Avaliacáo do poder bacteriostático e bactericida do Hidróxido de calcio utilizado como curativo de demora nos canais radiculares. Rev. Bras. Odontol; Vol 35, pag15-21, Marzo-Abril, 1978.
22. GALVEZ C., MENDOZA R. Capacidad bactericida de Pastas Experimentales Anti- A. Estudio in Vitro. Revista Odontológica Sanmarquina, vol. 1, N° 7, Enero-Junio, 2001.
23. DEL RÍO MARTÍNEZ, Pablo Ignacio. Actividad biocida de un propólis chileno frente a *Porphyromona gingivalis*: estudio in vitro. Tesis para obtener título de Cirujano Dentista. Santiago, Chile, 2006.
24. RUBIO FLORES, David. Estudio de la capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano de los adhesivos autograbantes frente a germen de la cavidad oral. Tesis para obtener el grado de doctor. Madrid, España, 2013.

25. PALOMINO M., MENDIOLA C., et al. Revascularización: nueva alternativa para el tratamiento de dientes inmaduros con pulpa no vital. Reporte de un caso. Revista Estomatología Herediana, vol 21, N°2, p.97-101, 2011.
26. REYNOLDS K., JOHNSON J., et al. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicusps using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. International Endodontic Journal, vol 10, N° 11, 2008.
27. JACINTO R.C., GOMES F.A., et al. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility, N° 18, p.285-292, 2003.
28. LITTERIO M., BIANCHINNI G., et al. Actividad in vitro de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias. Estudio multicéntrico, 1999-2002. Revista Argentina de Microbiología, N° 36: 130-135, 2004.
29. BRESCO-SALINAS M., COSTA-RIU N., BERINI-AYTES., GAY. ESCODA C. Susceptibilidad antibiótica de las bacterias causantes de infecciones Odontogenicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11:E70-5.
30. LANA MA, RIBEIRO-SOBRINHO A.P. et al. Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Inmunol, N°16, P.100-105, 2001.
31. LECORN DW., VERTUCCI FJ., et al. In vitro activity of amoxicillin, clindamycin, doxycycline, metronidazole, and moxifloxacin against oral Actinomyces. J Endod., N° 33(5), p.557-560, mayo 2007.
32. SMITH AJ., HALL V., et al. Antimicrobial susceptibility testing of Actinomyces species with 12 antimicrobial agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. N° 56 (2), p.407-409, 2005.
33. Paredes F., Roca JJ., et al. Acción de los antibióticos, prospectiva de la medicación antimicrobiana. OFFARM. Vol 23, N°3, p.116-124. 2004.
34. Seija V., Vignoli R., et al. Principales grupos de antibióticos. OFFARM. Vol 23, N°2, p 631-647. 2004.
35. Jordán J., Aguirre N., et al. Minociclina y neuroprotección: luces y sombras. Actualidad en farmacología y terapéutica. Vol 4, N°4, p 260-263. 2006.
36. Bendesky A., Menendez D., et al. Metronidazol: una vision integral. Revista Facultad de Medicina UNAMV. Vol 44, N°6, p.255-259. 2001.
37. Suarez A., Vera V., et al. Uso clínico del ciprofloxacino. MEDISAN. Vol 15, N°3, p.2-9. 2011.

38. Aas A, et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol 43, N^o11, p.5721-5732.2005.
39. Adnan H, et al. Evaluation of the antimicrobial effect of endodontics sealers on microbiota associated with root canal infections. *QMJ*. Vol 7, N^o 12, p.2-12. 2011.
40. VILLAR AYORA, Adriana. Manejo endodóntico de dientes con apices abiertos. Investigación bibliográfica del proceso de suficiencia profesional para obtener título de cirujano dentista. Lima, Perú. 2011.
41. Carreira C, et al. Antimicrobial effect of intracanal substances. *Journal of Applied oral science*. Vol 15, N^o 5, p 453-458.2007.

X. ANEXOS 1

1) Ficha de recolección de datos a una semana:

Actinomyces odontolyticus

FECHA: BACTERIA:	DIAMETRO DEL HALO, INCLUIDO EL DISCO EN mm.			Promedio
	<i>placa 1</i>	<i>placa 2</i>	<i>placa3</i>	
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO				
PASTA TRIANTIBIÓTICA				
SUERO FISIOLÓGICO(CONTROL -)				

2) Ficha de recolección de datos a los 20 días.

Porphyromonas gingivalis.

FECHA: BACTERIA:	DIAMETRO DEL HALO, INCLUIDO EL DISCO EN mm.			Promedio
	<i>placa 1</i>	<i>placa 2</i>	<i>placa3</i>	
PASTA DE HIDRÓXIDO DE CALCIO				
PASTA TRIANTIBIÓTICA				
SUERO FISIOLÓGICO(CONTROL -)				

Anexo 2

Foto 1: Adquisición de cepas: *Actinomyces odontolyticus* y *Porphyromona gingivalis*.

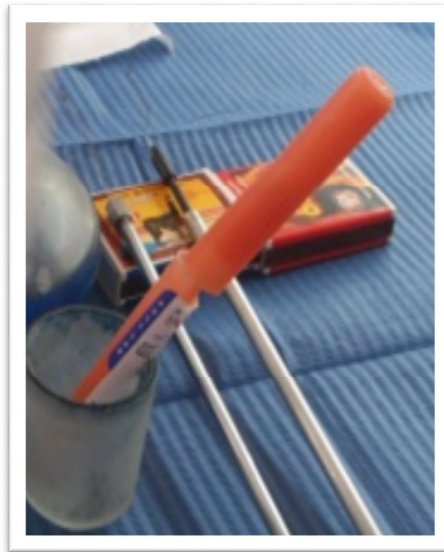


Foto 2: Preparacion de solución 1.5 Mc Farland

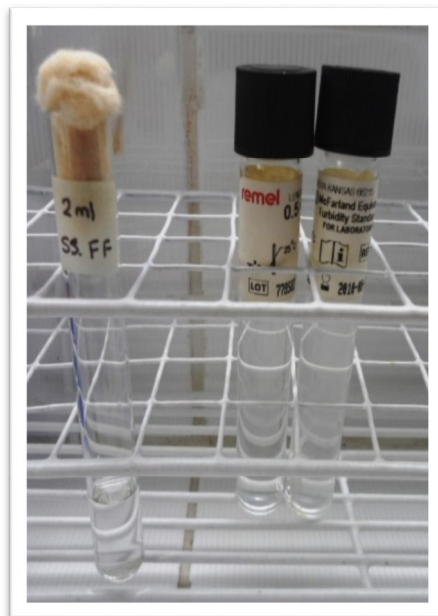


Foto3: Dispersión de la cepa *Actinomyces odontolyticus*

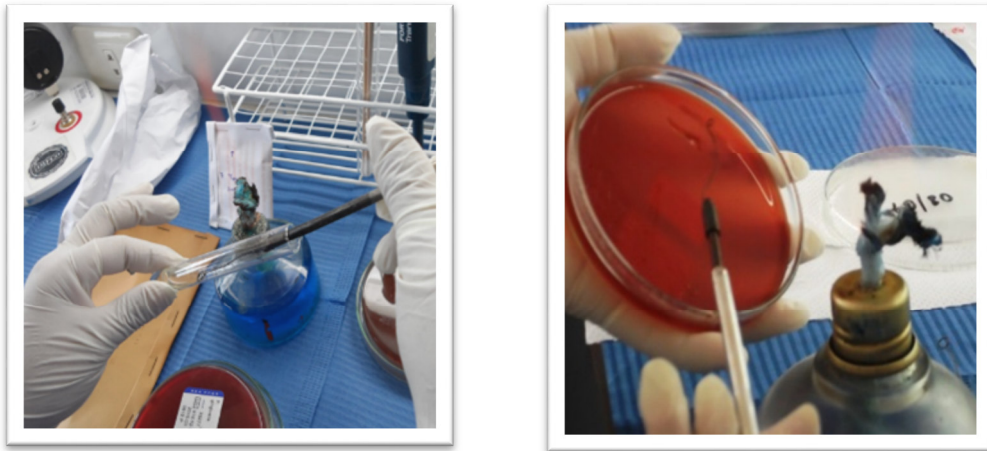


Foto 4: Cultivo de *Actinomyces odontolyticus*

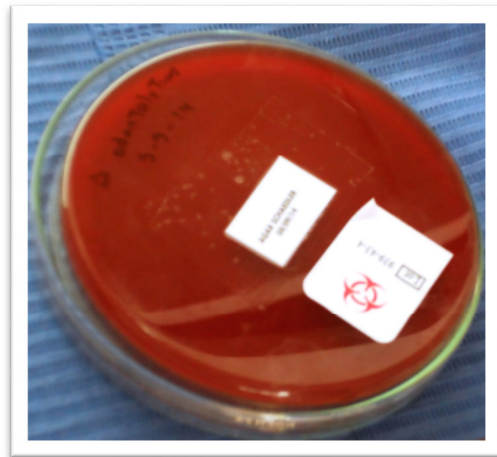


Foto 5: Dispersión de la cepa *Porphyromona gingivalis*.

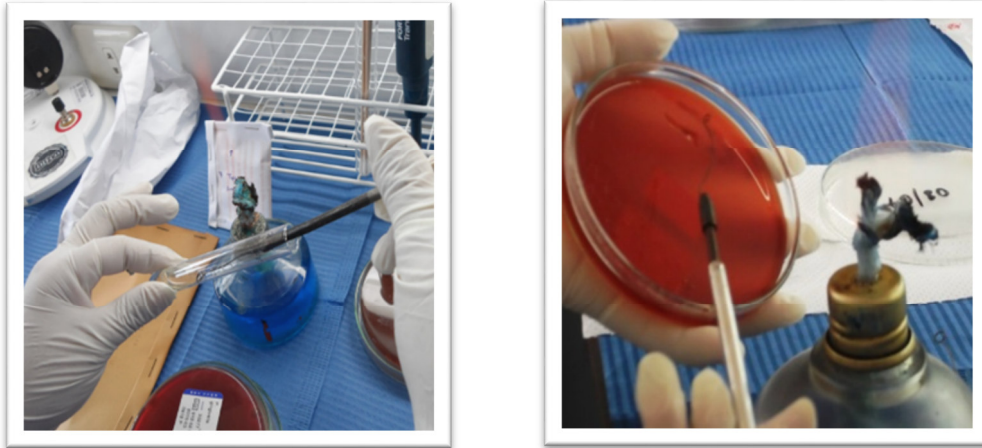


Foto 6: Cultivo de *Porphyromona gingivalis*

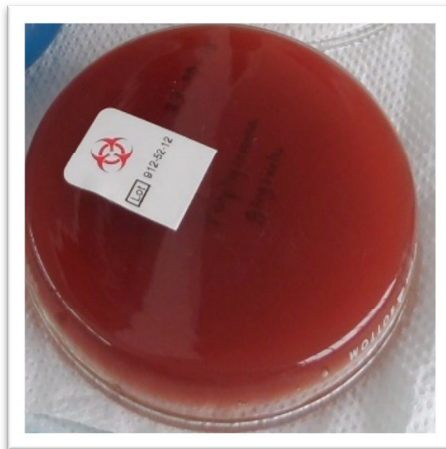


Foto 7: Aislamiento del cultivo de *Actinomyces odontolyticus* en jarra de anerobiosis



Foto 8: Incubación del cultivo de *Actinomyces odontolyticus* a 37 °C.



Foto 9: Aislamiento del cultivo de *Porphyromona gingivalis* en jarra de anerobiosis.



Foto 10: Incubación a 37 °C.



Foto 11: Crecimiento de *Actinomyces odontolyticus* después de 1 semana

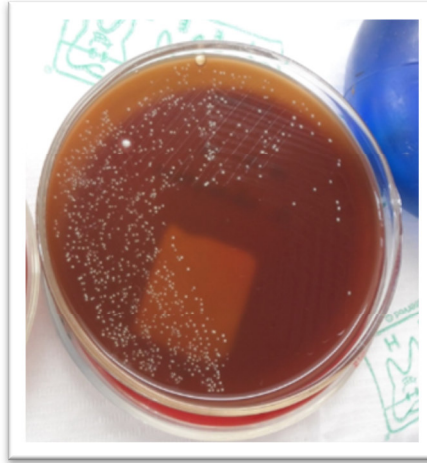


Foto 12: Crecimiento de *Porphyromona gingivalis* después de 20 días.



Foto 13: Preparación de pasta de pasta Tri mix y pasta de hidróxido de calcio 20%.



Foto 14: Aplicación de las pasta Tri mix (1ml), pasta de hidróxido de calcio 20% (1ml) y agua destilada (1ml) en pozos.

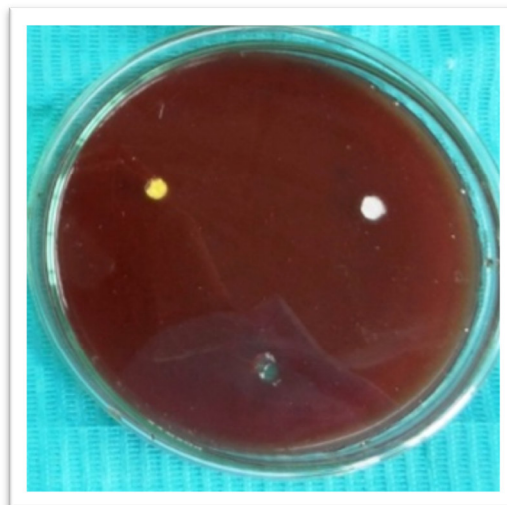
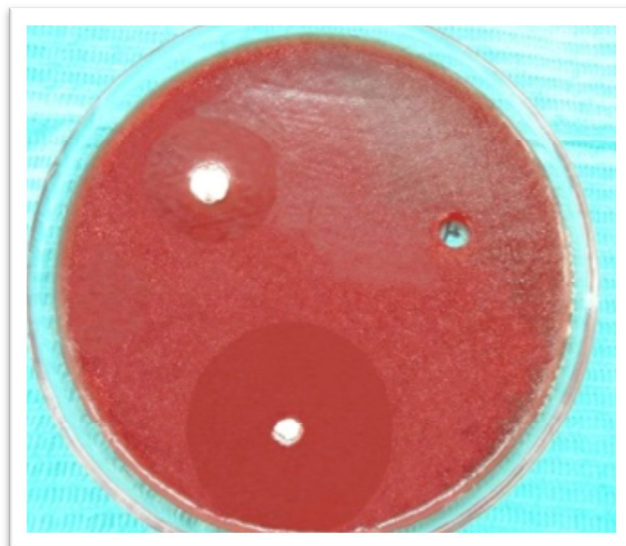


Foto 15: Incubación en jarra de anaerobiosis.



Foto 16: Lectura de los halos de inhibición de *Actinomyces odontolyticus* después de una semana.



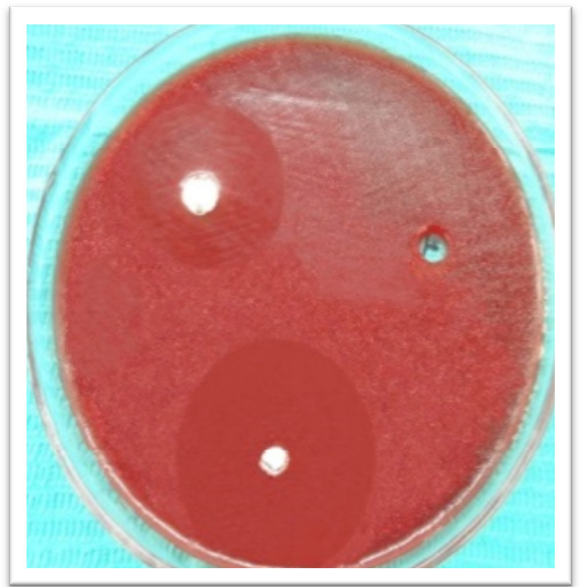
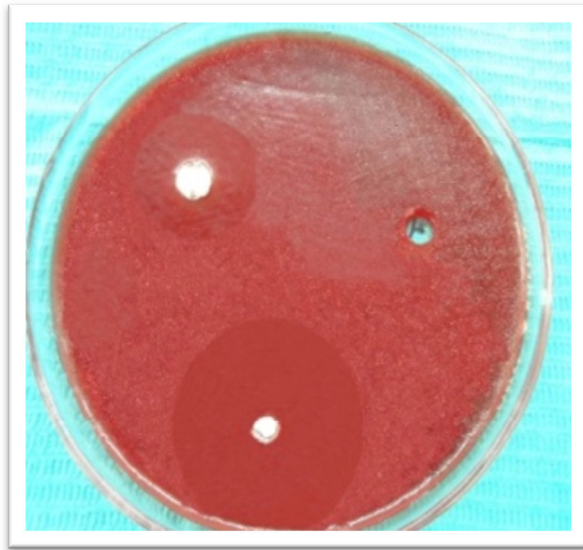
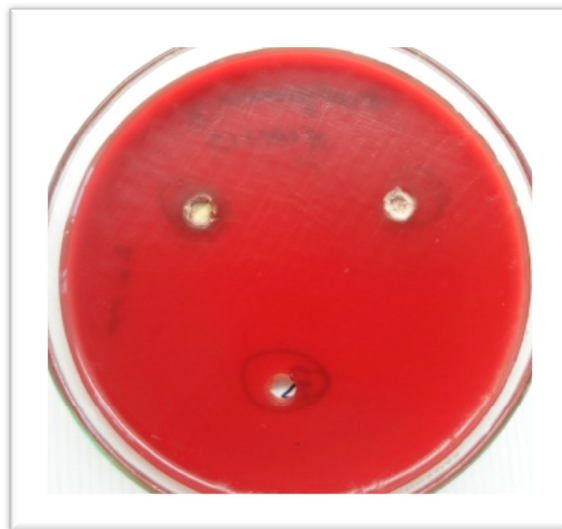
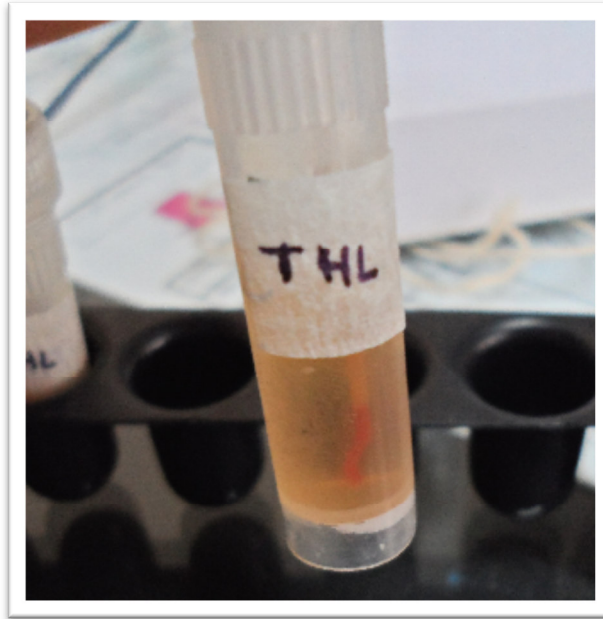


Foto 17: Lectura de halos de inhibición de *Porphyromona gingivalis*

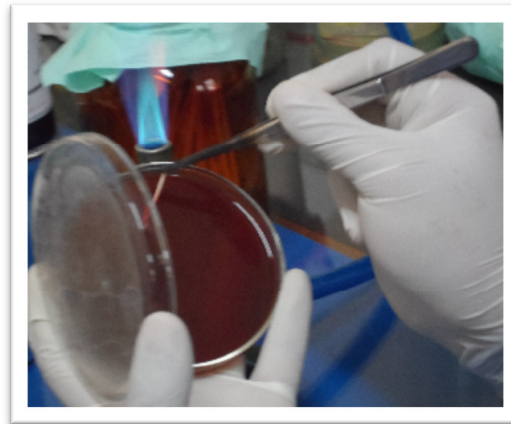


Fotos de Piloto

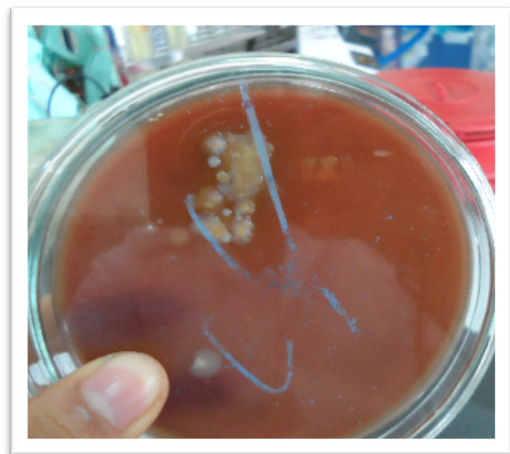
- 1) Toma de muestra de conductos radiculares de dientes necróticos jóvenes, con conos de papel y se trasladaron en caldo tioglicolato



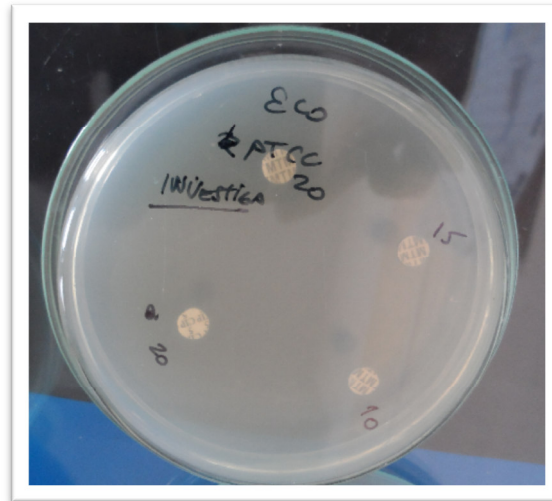
2) Se realizó el cultivo de los conos de papel (muestra) en Agar Shadler.



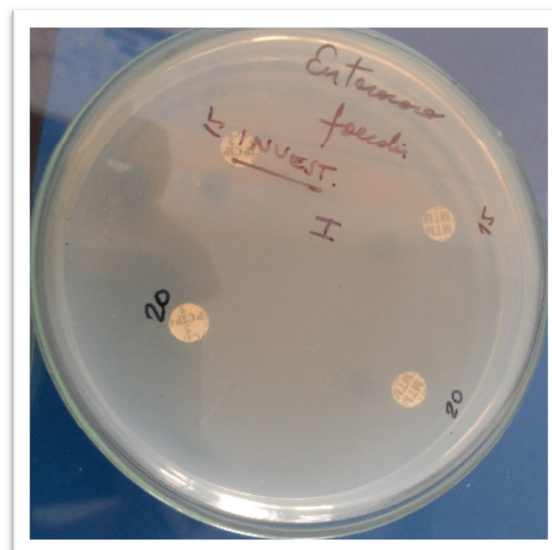
3) Crecimiento bacteriano en Agar Shadler después de 72 horas.



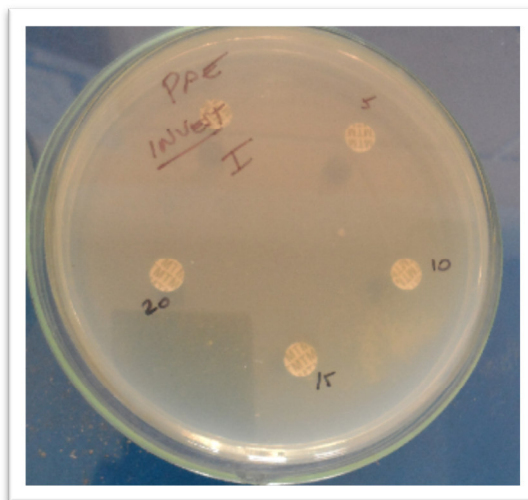
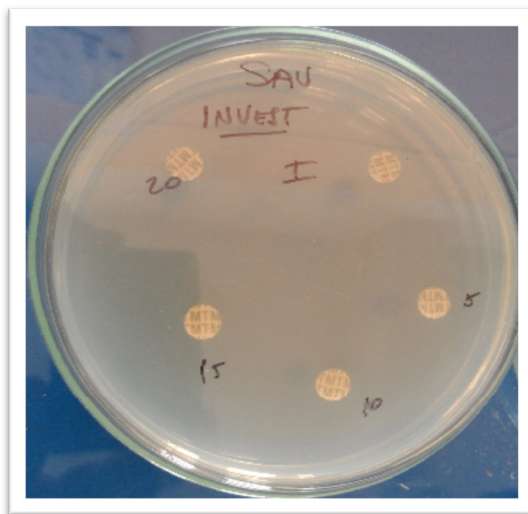
- 4) Prueba de susceptibilidad bacteriana de la pasta de hidróxido de calcio al 15 % y 20% con discos de antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino) frente *Escherichia coli*.



- 5) Prueba de susceptibilidad bacteriana de la pasta de hidróxido de calcio al 15 % y 20% con discos de antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino) frente *Enterococcus faecalis*.



- 6) Prueba de susceptibilidad bacteriana de la pasta de hidróxido de calcio al 5 %, 10%, 15% y 20% con discos de antibióticos (metronidazol y ciprofloxacino) frente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.



7) Lecturas

